

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461422

研究課題名(和文) 低線量被曝からMDS発症に至る疫学的解析および分子発症プロセスの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of radiation-associated myelodysplastic syndromes (MDS)

研究代表者

原田 結花 (HARADA, Yuka)

文京学院大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50379848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群関連疾患の遺伝子変異を解析したところ、低線量被曝例では2km以内の直接被曝者よりもむしろ高率にRUNX1変異が認められた。特に黒い雨被曝例はいずれもRUNX1変異を有する慢性骨髄単球性白血病(CMML)であった。そこでCMMLを含む骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍症例を集積し、発症機序の解析を行った。CMMLではRUNX1変異が高頻度であり、スプライシング因子変異に関連して病期進展に伴い短縮型RUNX1a高発現が認められた。低線量被曝によりRUNX1変異が生じやすいという仮説に加え、RUNX1変異造血幹細胞が放射線傷害に耐性で残存し、クローン性に増殖する機序も想定された。

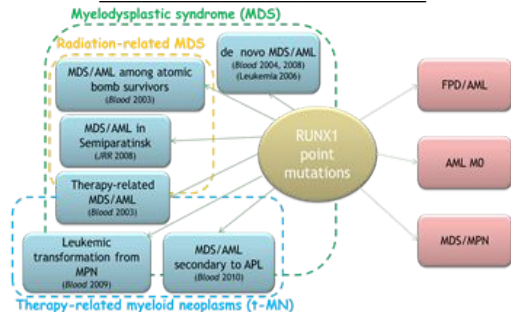
研究成果の概要(英文)：We analyzed gene mutations in patients with myeloid neoplasms mainly myelodysplastic syndromes (MDS) including atomic bomb survivors in Hiroshima. Low dose radiation-associated MDS patients showed slightly higher frequency of RUNX1 mutations than the patients within 2 km from hypocenter. Especially, both of 2 patients exposed to "black rain", which contains radioactive fallout just after atomic bomb in Hiroshima, developed chronic myelomonocytic leukemia (CMML) with RUNX1 mutations. Therefore, we investigated gene abnormalities in CMML patients and found high frequency of RUNX1 mutations. Furthermore, high expression of RUNX1 short isoform (RUNX1a) was associated with mutations of splicing factors which were frequently found in CMML. It is suspected that RUNX1 mutations may be induced by low dose radiation. In addition, hematopoietic stem cells with RUNX1 mutations may have resistance to irradiation and proliferate after radiation injury.

研究分野：血液内科学

 キーワード：低線量被曝 RUNX1変異 骨髄異形成症候群 骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍 慢性骨髄単球性白血病 ス
 プライシング因子変異

1. 研究開始当初の背景

RUNX1 遺伝子変異は、骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) に認められ、発症機構の主要部を担う遺伝子異常の一つである。研究代表者らのこれまでの研究により明らかにした骨髄系腫瘍における RUNX1 変異結果を下に示す。とりわけ、放



射線や治療関連 MDS における頻度は高く、RUNX1 変異は放射線や化学療法による MDS のバイオマーカーの 1 つと考えられている。そして今回、特に低線量被曝に注目した解析を立案した。

- 1) 原爆被曝者の MDS 患者や化学療法・放射線療後の MDS/AML 症例に、N 末側 RUNX1 変異が高率に認められることを見出した (Blood2003)。C 末側の解析結果を合わせると、MDS/AML では高率に RUNX1 変異が認められ、続発性 MDS/AML 患者では圧倒的に N 末側変異が多いことを見出した (Blood2004 他)。
- 2) MDS 発症には複数の遺伝子異常の蓄積が必要であり、RUNX1 変異と協調する遺伝子変異として高率に RTK ~ RAS シグナル伝達系の活性化異常を認めることを示した (Leukemia 2006)。
- 3) 旧ソ連の核実験場であったセミパラチンスク (SNTS) 近郊住民の MDS でも RUNX1 変異が高率で、推定被曝線量に比例することが示唆された (JRR2008)。
- 4) RUNX1 変異の腫瘍原性を検討するため、マウス移植モデル実験を行った。RUNX1 変異導入マウスは MDS/AML を発症し、Evi1 高発現と協調して白血病を発症した (Blood2008)。
- 5) 慢性骨髄増殖性腫瘍 (MPN) からの白血病化が、治療関連骨髄性腫瘍 (t-MN) と同様の分子機序を呈することを明らかにし、中でも RUNX1 変異が高率で MPN の造血幹細胞に白血病原性を付与する因子であることを証明した (Blood2009)。
- 6) 急性前骨髄球性白血病 (APL) では、治療後に t-MN を発症する予後不良の症例が認められ、その発症に RUNX1 変異が高率に寄与することを明らかにした (Blood2010)。
- 7) ヒト造血幹細胞では、RUNX1 変異は

BMI1 高発現と協調して MDS 発症に関わることを示した (Blood2013)。RUNX1 変異体の多くは腫瘍原性作用を有しており、正常造血幹細胞を潜在的 MDS 発症細胞へと変化させる、MDS 発症の中心的役割を担うマスター遺伝子変異といえる。

以上の研究成果などから、RUNX1 遺伝子は放射線や化学療法に感受性が高く、特にその変異は原爆被曝者・セミパラチンスク核実験場周辺住民・チェルノブイリ原発事故被曝住民や除染作業者の MDS 患者で高頻度であることが明らかになった。実際、放射線や化学療法剤は正常造血幹細胞の RUNX1 遺伝子に異常を来す (投稿中)。したがって、RUNX1 遺伝子は比較的低線量の放射線による影響を受けて変異を生じ、長い年月を経て MDS の発症に至ると推測される。

2. 研究の目的

本研究では、低線量被曝後に MDS を発症する頻度に関する疫学的解析と、その発症に関わる遺伝子異常の解析による分子発症プロセスの解明を目指す。

1945 年の広島原爆投下時、爆心に近いところで被曝した直爆者の健康被害についてはこれまでに詳細に検討されてきたが、直後に降った放射性物質を含む“黒い雨”に暴露された住民、爆心地から 2km 以遠で被曝した人、あるいは原爆投下後に爆心地付近に入った人などは、これまで放射線被曝がほとんど問題にされてこなかった。広島原爆の初期放射線はガンマ線が主体で、爆心地からの距離にしたがって指数関数的に減少しており、これまでの研究では、白血病の過剰発症は被曝線量に依存し爆心地から 2km 以内に限られるとされていた。ところが被曝後 50 年以上を経て発症する MDS では、2km 以遠にも発症が認められる。

また最近の解析により、被曝時所在地に関する死亡危険度の地理分布の等高線が北西方向に峰が張り出した楕円形で推定され、被曝距離が同じでも北西方向の地点での被曝者はより高い死亡危険度を有する可能性が示唆された。黒い雨は、原爆投下直後の数時間にわたって主に広島市の西部～北部に降ったことが明らかにされていることから、黒い雨による間接被曝や内部被曝が死亡危険度に影響している可能性が示唆されている。

2011 年 3 月の福島第一原発事故以降、低線量被曝による人体影響が懸念される中、これまで明らかにされていなかった“黒い雨”による健康被害の実態調査がようやく始まったところである。さらに近年、被曝歴のある MDS 症例が増加している。本研究では、低線量被曝による MDS 発症の実態を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

MDS/AML 患者について、被爆状況特に黒い雨への曝露歴などを聞き取り調査して低線量被曝者を抽出し、検体を採取する。新規または保存患者サンプルを用いて *RUNX1* 変異などの遺伝子異常を検索し、被曝線量との関係を解析する。また新規サンプルを用いた網羅的な遺伝子発現・遺伝子変異の解析を行い、低線量被曝後 MDS/AML の発症に関わる遺伝子異常を解明する。これらを基に低線量被曝が MDS/AML 発症に及ぼす影響について解析を行い、低線量被曝による人体影響を予測する。

- 1) “黒い雨”などの低線量被曝症例の抽出：新規に MDS/AML を発症した患者や受診中の MDS/AML 患者について、被爆時爆心地からの距離、黒い雨への曝露歴の有無および原爆投下後の爆心地付近への立ち入り（入市被曝）を調査する。研究へのインフォームド・コンセントが得られた MDS/AML 患者の骨髓液あるいは末梢血から、DNA・RNA を抽出する。また CD34 陽性細胞を分取し、RNA を抽出する。
- 2) 低線量被曝症例の遺伝子異常解析：DNA サンプルを用い、*RUNX1* 遺伝子変異をダイレクトシーケンス法により解析する。RNA サンプル（特に CD34 陽性細胞を分取して抽出したもの）を用いて、*BMI1* などの *RUNX1* 変異と協調して MDS/AML 発症に働くと考えられる遺伝子について、定量的 PCR 法を用いた発現量の解析を行う。
- 3) 低線量被曝による分子発症プロセスの解明：患者サンプルを用い、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現の解析や全ゲノムエクソンシーケンスによる網羅的遺伝子変異解析を行う。低線量被曝による MDS/AML 症例と非被曝症例や高線量被曝症例などとの比較を行うことにより、低線量被曝に特異的な遺伝子異常を解明する。
- 4) 低線量被曝による人体影響の解析：低線量被曝が MDS/AML 発症に及ぼす影響について、統計学的解析を行う。

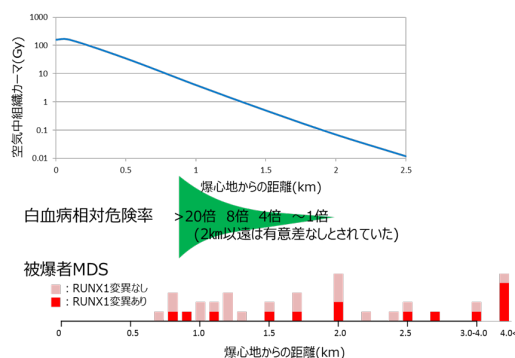
4. 研究成果

1) 低線量被曝症例の抽出と解析

骨髄異形成症候群（MDS）を含む骨髄系腫瘍症例からインフォームド・コンセントを得て検体を採取した。その中で広島原爆の直接被曝症例は 33 名、黒い雨被曝症例は 2 名、原爆投下翌日以降に広島市内に入った入市被曝者は 22 名であり、これらの症例について *RUNX1* 変異を解析した。*RUNX1* 変異は、化学療法や放射線療法後の治療関連造血器腫瘍症例に高率に認められ、放射線や化学療法による MDS のバイオマーカーの一つと考えられる遺伝子異常の一つであるが、これまで

の解析でも 2km 以上の遠距離直爆例など低線量被曝症例にも認められていた。そこで今回、これまでほとんど解析されていなかった低線量被曝に注目し、低線量被曝後非常に長い期間を経て MDS を発症した症例において *RUNX1* 変異を中心とした遺伝子異常の解明を試みた。

被曝者の骨髄系腫瘍患者では、36.1%と非被曝者（16.5%）よりも高頻度に *RUNX1* 変異が認められた。爆心地からの距離により *RUNX1* 変異の有無を解析すると、遠距離被曝者では 2km 以内の直接被曝者よりもむしろやや多い割合で変異が認められた。また、



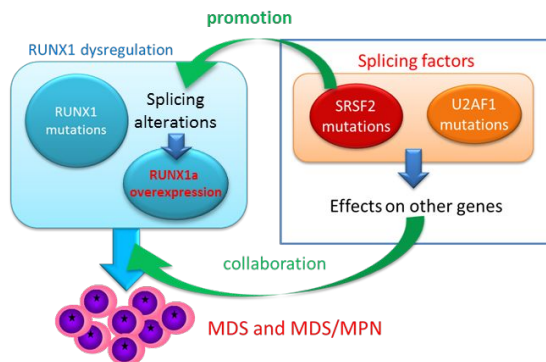
爆心地から 4km 以遠で黒い雨による被曝を受けた 2 症例は、いずれも *RUNX1* 変異を有しており、慢性骨髄単球性白血病と診断されていた。それ以上の黒い雨被曝者は今回の調査では見つからなかった。

2) 慢性骨髄単球性白血病の病態解析

慢性骨髄単球性白血病（chronic myelomonocytic leukemia：CMML）は、FAB 分類では MDS の一亜型に分類されていたが、単球増加を伴い細胞増殖性が強いことから、WHO 分類では新たに作られた「骨髄異形成 / 骨髄増殖性腫瘍（MDS/MPN）」に組み入れられた。CMML では MDS と同等あるいはそれ以上に *RUNX1* 変異が高頻度であり、この疾患の病態解明が低線量被曝による骨髄系腫瘍発症機序の解明につながると考えられた。今回の黒い雨被曝症例はわずか 2 名であったことから、非被曝症例を含めて CMML 患者サンプルを収集し、解析を行った。

CMML を含む MDS/MPN 症例では、35% に *RUNX1* 変異が認められ、同時期に解析した MDS 症例における頻度（20%）よりも高頻度であった。また *RUNX1* 変異のない症例でも、短縮型アイソフォームである *RUNX1a* の高発現が病期進展に伴って認められた。その一因としてスプライシング因子の遺伝子変異の可能性が疑われ、実際 MDS/MPN 症例では半数に *SRSF2* 変異または *U2AF1* 変異が認められた。したがって、低線量被曝により *RUNX1* 変異が生じている症例以外にも、*SRSF2* 変異や *U2AF1* 変異が生じることにより *RUNX1a* 高発現を来している症例もあ

ることが推察され, RUNX1 異常とスプライシング因子との密接な関連が示唆された。



3) RUNX1 変異と放射線感受性

我々の解析により, 骨髄系腫瘍患者に認められる RUNX1 変異が, 様々な遺伝子異常と協調して造血機能破綻をきたすことが解明されてきた。この結果を基に, 被曝後年月を経て MDS を発症する機序が少しずつ明らかになりつつある。

最近, RUNX1 欠損マウスの造血幹細胞は放射線に対する感受性が低いことが明らかにされた。すなわち, RUNX1 欠損造血幹細胞は, 放射線傷害によるアポトーシスから逸脱し, いわば耐性を獲得していると推測される。このことは, 放射線により RUNX1 変異が生じやすいという仮説に加え, 既存の RUNX1 変異を有する造血幹細胞が放射線傷害に耐性で残存し, そこからクローン性に増殖することも想定される。後者の仮説を検証するために, 骨髄系腫瘍未発症の低線量被曝者における RUNX1 変異を評価する RUNX1 変異微小クローンの検出法開発をスタートさせた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 31 件)

1. Sakurai M, Kasahara H, Yoshida K, Yoshimi A, Kunitomo H, Watanabe N, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Harada Y, Harada H, Kawakita T, Kurokawa M, Miyano S, Takahashi S, Ogawa S, Okamoto S, Nakajima H: Genetic basis of myeloid transformation in familial platelet disorder/acute myeloid leukemia patients with haploinsufficient RUNX1 allele. *Blood Cancer J* 6: e392, 2016. doi: 10.1038/bcj.2015.81. (査読有)
2. 原田結花, 原田浩徳.【特集:臨床血液学最新情報と今後の展望 2016 年版(その 1)】慢性骨髄単球性白血病(CMML:病態解明の進歩と治療の現在). *臨床血液* 57(2), 147-155, 2016. doi: 10.11406/rinketsu.57.147. (査読有)

3. Hirano T, Yoshikawa R, Harada H, Harada Y, Ishida A, Yamazaki T. Long noncoding RNA, CCDC26, controls myeloid leukemia cell growth through regulation of KIT expression. *Mol Cancer* 14(1): 90, 2015. doi: 10.1186/s12943-015-0364-7. (査読有)
4. Harada H, Harada Y. Recent advances in myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer Sci* 106(4): 329-336, 2015. doi: 10.1111/cas.12614. (査読有)
5. Sakurai M, Kunitomo H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia* 8(12): 2344-2354, 2014;. doi:10.1038/leu.2014.136 (査読有)
6. Lam K, Muselman A, Du R, Harada Y, Scholl AG, Yan M, Matsuura S, Weng S, Harada H, Zhang DE. Hmg2 is a direct target gene of RUNX1 and regulates expansion of myeloid progenitors in mice. *Blood* 124(14): 2203-2212, 2014. doi:10.1182/blood-2014-02-554543 (査読有)
7. Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Hayashi Y, Suzuki K, Nakajima H, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, Iwama A. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nature communications* 5: 4177, 2014. doi:10.1038/ncomms5177 (査読有)
8. 佐藤裕哉, 佐藤 健, 原田結花, 嶋本浩子, 原憲行, 原田浩徳, 大瀧 慈, 田代 聡. 原爆・被ばく関連資料データベース(新聞記事)のテキスト解析の試み. *広島医学* 67(4): 406-409, 2014. (査読無)
9. 岡田浩佑, 鎌田七男, 藤村欣吾, 河村 寛, 中井志郎, 田中公夫, 小熊信夫, 許 泰一, 岩戸康司, 板垣充弘, 宮原弥恵, 新谷貴洋, 原田浩徳, 佐々木英夫. 広島で近距離被曝後に長期間を経て白血病を発症した母娘例. *広島医学* 67(4): 396-400,

2014. (査読無)
10. 原田結花, 北村俊雄, 原田浩徳. 骨髓異形成症候群における RUNX1 変異と BMI1 過剰発現の協調作用. 血液内科 68(6): 805-813, 2014. (査読無)
 11. 原田結花, 原田浩徳. 【血液疾患とクローン性】造血器腫瘍のクローン性進展 骨髓異形成症候群の病型悪化とクローン性進展. 血液フロンティア 24(6): 895-902, 2014. (査読無)
 12. Imagawa J, Harada Y, Shimomura T, Tanaka H, Okikawa Y, Harada H: High early death rate in elderly patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid combined chemotherapy. *Int J Hematol* 98(2); 264-266, 2013. doi:10.1007/s12185-013-1390-0 (査読有)
 13. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, Harada H: RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood* 121(17); 3434-3446, 2013. doi: 10.1182/blood-2012-06-434423 (査読有)
 14. 原田結花, 原田浩徳. CMML 発症のゲノム異常. 血液内科 67(5):631-637, 2013. (査読無)
- [学会発表](計 36 件)
1. 原田浩徳. Dysregulation of RUNX1 Plays a Critical Role in the Progression of Myelodysplastic Syndromes. 第 20 回造血器腫瘍研究会, かずさアーク (千葉県木更津市), 2016/2/12.
 2. Sakurai H, Harada Y, Matsui H, Nakajima H, Kitamura T, Komatsu N, Harada H. Dysregulation of RUNX1 Plays a Critical Role in the Progression of Myelodysplastic Syndromes. 57th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco (USA), 2014/12/7.
 3. Harada H, Sakurai H, Harada Y, Kitamura T, Komatsu N. Overexpression of RUNX1 short isoform plays a pivotal role in the development of myelodysplastic syndromes. *The RUNX Transcription Factors in Development and Disease*, Rehovot (Israel), 2015/10/19.
 4. Sakurai H, Harada Y, Matsui H, Nakajima H, Doki N, Kakihana K, Ohashi K, Kitamura T, Komatsu N, Harada H. Overexpression of RUNX1 short isoform plays a pivotal role in the development of MDS/MPN. 第 77 回日本血液学会学術集会, 石川県立音楽堂 (石川県金沢市), 2015/10/17.
 5. Sakurai H, Harada Y, Matsui H, Nakajima H, Doki N, Kakihana K, Ohashi K, Kitamura T, Komatsu N, Harada H. Overexpression of RUNX1 short isoform plays a pivotal role in the development of MDS/MPN. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015/10/8.
 6. Sakurai H, Harada Y, Matsui H, Nakajima H, Kitamura T, Komatsu N, Harada H. Overexpression of RUNX1 short isoform plays a pivotal role in the development of myelodysplastic syndromes/myeloproliferative neoplasms. ISEH 44th Annual Scientific Meeting, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan), 2015/9/18.
 7. 原田浩徳. 機能獲得型 RUNX1 変異による骨髓異形成症候群の発症機序. 第 19 回造血器腫瘍研究会, グランテはがくれ (佐賀県佐賀市), 2015/1/23.
 8. Harada H, Harada Y, Inoue D, Ding Y, Sashida G, Iwama A, Nakajima H, Tanaka J, Komatsu N, Kitamura T. C-terminal truncation type of RUNX1 mutants induce MDS/AML via gain-of-function mechanisms. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場 (大阪市北区), 2014/10/31.
 9. 原田浩徳. 機能獲得型 RUNX1 変異による骨髓異形成症候群の発症機序. 2014 新学術領域細胞運命制御班会議, 東京大学医科学研究所 (東京都港区), 2014/9/4.
 10. Harada H, Harada Y, Inoue D, Sashida G, Iwama A, Nakajima H, Komatsu N, Kitamura T. C-terminal truncation type of RUNX1 mutants induce MDS/AML via gain-of-function mechanisms. ISEH 43rd Annual Scientific Meeting, Montreal (Canada), 2014/8/22.
 11. Harada H, Harada Y, Inoue D, Ding Y, Matsui H, Sashida G, Iwama A, Kitamura T. RUNX1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine MDS/AML. 第 75 回日本血液学会学術集会, ロイトン札幌 (札幌市中央区), 2013/10/12.
 12. Harada H, Harada Y, Inoue D, Kitamura T. RUNX1/AML1 mutants collaborate with BMI1 in the development of myelodysplastic syndromes. EMBO Workshop RUNX transcription factors in development & disease, Wilsede

(Germany), 2013/6/18.

〔図書〕(計10件)

1. 原田結花, 原田浩徳. Epigenetic changes と白血病 CpG アイランドのメチル化やヒストン脱アセチル化. 造血器腫瘍アトラス改訂第5版, 阿部達生編, 日本医事新報社, 2016 (印刷中).
2. 原田結花, 原田浩徳. アルキル化薬による染色体異常とMDSの発生. 造血器腫瘍アトラス改訂第5版, 阿部達生編, 日本医事新報社, 2016 (印刷中).
3. 原田結花, 原田浩徳. 3章 診断と検査の基本 20 遺伝子検査. Principles and Practice 血液・造血器・リンパ系, 千葉 滋編, 385 (pp106-111), 文光堂, 2015.
4. 原田結花, 原田浩徳. MDS の遺伝子異常スペクトラムと臨床的意義. 骨髄異形成症候群(MDS)の基礎と臨床 改訂版, 朝長万左男編, 323 (pp194-203), 医薬ジャーナル社, 2015.
5. 原田結花, 原田浩徳. エピゲノム異常と発がん. 新・カラーテキスト血液病学, 木崎昌弘編, 688 (pp41-45), 中外医学社, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 結花 (HARADA, Yuka)
文京学院大学・保健医療技術学部・教授
研究者番号: 5 0 3 7 9 8 4 8

(2)研究分担者

原田 浩徳 (HARADA, Hironori)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 1 0 3 1 4 7 7 5